

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MONICA VISNIESKI ALCANTARA**

**OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS  
ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP<sup>C</sup>)**

**CURITIBA**  
**2007**

**MONICA VISNIESKI ALCANTARA**

**OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS  
ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP<sup>C</sup>)**

**Monografia apresentada à disciplina  
BP024 – Estágio em Patologia Básica,  
como requisito para a obtenção do  
título de bacharel no curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Sílvio Marques  
Zanata**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ida Cristina  
Gubert**

**CURITIBA  
2007**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 A PROTEÍNA PRION CELULAR .....	01
1.1.1 As Doenças .....	01
1.1.2 Características da Proteína Prion Celular .....	03
1.1.3 O PrP <sup>c</sup> e suas interações .....	04
1.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	06
<b>2. JUSTIFICATIVAS</b> .....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
4.1 CULTIVO DE CÉLULAS DE MIELOMA .....	12
4.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO ANIMAL IMUNIZADO .....	12
4.3 FUSÃO DAS CÉLULAS DE MIELOMA COM AS CÉLULAS DO BAÇO .....	13
4.4 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS APÓS A FUSÃO .....	14
4.5 TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS (SCREENING) .....	15
4.5.1 Ensaios de ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ) .....	15
4.5.2 Ensaios de Immunoblot .....	15
4.6 IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES .....	16
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	18
5.1 FUSÃO DOS HIBRIDOMAS .....	18
5.2 TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS .....	19
5.3 SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP <sup>c</sup> .....	23
5.3.1 Ensaio de ELISA de captura de anticorpos .....	23
5.3.2 Ensaio de <i>Immunoblot</i> .....	24
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	27
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – CÉLULAS DE HIBRIDOMAS VIÁVEIS.....	18
<b>FIGURA 2</b> – <i>IMMUNOBLOT</i> COM OS SOBRENADANTES DOS HIBRIDOMAS EXPANDIDOS .....	20
<b>FIGURA 3</b> – <i>IMMUNOBLOT</i> COM OS SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES IMUNIZADOS COM PrP <sup>c</sup> .....	25

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> – RESULTADO DO 1º ELISA PARA A TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTI-PrP <sup>C</sup> .....	19
<b>GRÁFICO 2</b> – TESTE DE ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPOS COM O SORO DO CAMUNDONGO UTILIZADO NA FUSÃO .....	23
<b>GRÁFICO 3</b> – ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPOS COM OS SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP <sup>C</sup> .....	24

## RESUMO

A proteína prion celular (PrP<sup>c</sup>) é uma proteína altamente conservada entre as espécies e localiza-se na face extracelular da membrana plasmática via âncora GPI. Possui expressão ubíqua, estando concentrada principalmente em tecidos do sistema nervoso, em particular em neurônios e células da glia. Sua isoforma, PrP<sup>sc</sup> (proteína prion scrapie), é patogênica e infecciosa, a qual causa doenças neurodegenerativas fatais. Anticorpos são ferramentas imuno-químicas de grande relevância, tanto na pesquisa básica como na diagnóstica e podem ser produzidos por uma mistura de células B, o que caracteriza os anticorpos policlonais, ou produzidos por um único clone de célula B e, portanto, possuem especificidade única e conhecida (anticorpos monoclonais). O presente trabalho tem como objetivo a produção de anticorpos específicos para o PrP<sup>c</sup>, através da fusão de células de mieloma com células esplênicas de camundongo nocaute imunizado com o PrP<sup>c</sup> recombinante. Obteve-se êxito no resultado da fusão e vários clones de hibridomas cresceram em cultura. Além disso, foi detectada a secreção de anticorpos por alguns desses clones. Entretanto, tais clones não permaneceram estáveis e pararam de secretar anticorpos ou morreram. É sabido que a manutenção dos clones, em cultura, por períodos prolongados pode provocar redução na secreção de anticorpos, podendo inclusive cessar. Além disso, a linhagem de mieloma utilizada nesta fusão expressa grande quantidade de PrP<sup>c</sup> em sua superfície, e os anticorpos secretados por essas células podem ligar-se ao antígeno, impedindo-o de desempenhar algumas funções vitais para a célula, tornando o hibridoma instável. A resposta imune do camundongo utilizado para a fusão também é fator determinante para a obtenção de resultados positivos, e a idade avançada do camundongo pode ter sido outra causa do insucesso na produção de anticorpos pelos clones, já que as células esplênicas utilizadas para a fusão que de fato secretavam anticorpos deveriam estar em número bastante limitado.

## ABSTRACT

Cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) is a highly conserved protein among the species and is localized on the outer plasmatic membrane by a GPI anchor. It has a ubiquitous expression, and is mainly concentrated in the central nervous system tissues, particularly in neurons and in glial cells. Its isoform, called PrP<sup>sc</sup> (scrapie prion protein), is pathogenic and infectious, and causes fatal neurodegenerative diseases. Antibodies are immunochemical tools of great relevance, both in basic research and in diagnosis purposes. Polyclonal antibodies can be produced by a mixture of B cells while monoclonal antibodies are secreted by a single B cell clone, thereby having a unique and known specificity. The objective of the present work is to produce specific monoclonal antibodies to PrP<sup>c</sup>, through the fusion of myeloma cells with splenic cells of PrP<sup>c</sup> knockout mice immunized with recombinant PrP<sup>c</sup>. The fusion was successful, and many clones of hybridomas grown in culture. In addition, it was detected the antibody secretion by some of that clones. However, that clones were not stable and stopped to secrete antibodies or died. It is known that the maintenance of the clones in culture for long times can induce the reduction in the secretion of antibodies, and it can even stop. Moreover, the myeloma cell line used in this fusion expresses high quantities of PrP<sup>c</sup> in its surface, and the antibodies secreted by these cells could bind to the antigen, blocking some of its vital functions for the cell, leading to an unstable hybridoma. The immune response of the mice used for the fusion is another determinant factor for obtaining positive results, and the mice's advanced age can be another cause of the failure in the production of antibodies by the clones, because the number of splenic cells used for the fusion that secreted antibodies should be limited.

## INTRODUÇÃO

### 7.1 A PROTEÍNA PRION CELULAR

#### 7.1.1 As doenças

As doenças Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), Scrapie de ovelha e Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) de humanos estão entre as doenças de prion mais notáveis (PRUSINER, 1998b). São doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais, que podem aparecer esporadicamente (em aproximadamente 85% dos casos), podem ser hereditárias pela mutação no gene do prion (aproximadamente 15% dos casos) ou adquiridas através de exposição médica ou a dietas com tecidos contaminados. (LAWSON *et al.*, 2005).

As formas esporádicas das doenças priônicas constituem a maior parte dos casos de CJD. Nesses pacientes, mutações no gene de PrP (proteína prion) não foram encontradas. Hipóteses incluem transmissão horizontal de prions provindos de humanos ou animais, mutações somáticas no gene de PrP, e conversão espontânea do PrP<sup>C</sup> (Proteína Prion Celular) em PrP<sup>Sc</sup> (Proteína Prion Scrapie) (PRUSINER, 1998b).

Para as doenças priônicas hereditárias, até hoje foram descobertas 20 diferentes mutações no gene humano de PrP resultando em substituições não-conservativas. Estudos demonstraram que extratos provindos de pacientes com alguma doença priônica hereditária transmitem a doença para camundongos transgênicos (PRUSINER, 1998b).

As doenças infecciosas de prion incluem o Kuru, das populações nativas da Papua, Nova Guiné, onde prions eram transmitidos em rituais canibalísticos. As origens dos prions que causam a CJD infecciosa em muitos continentes diferentes incluem córneas transplantadas, hormônio humano do crescimento (HGH) e gonadotropina derivados de hipófises cadavéricas, etc. (PRUSINER, 1998b). A natureza transmissível dessas doenças as separa de outras doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer ou de Parkinson, as quais surgem esporadicamente ou são hereditárias por mutações no gene-hospedeiro. (LAWSON *et al.*, 2005).



A marca-registrada de todas as doenças de prion é que elas envolvem o metabolismo aberrante e conseqüente acumulação da proteína prion. A conversão do PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup> envolve uma mudança conformacional, e a deposição do PrP<sup>Sc</sup> é responsável pelas mudanças neuropatológicas nas doenças de prion (PRUSINER *et al.*, 1996). O PrP<sup>C</sup> é convertido em PrP<sup>Sc</sup> através de um processo onde uma porção de sua estrutura  $\alpha$ -hélice é re-enovelada em folha- $\beta$  (PRUSINER, 1998b). Essa transição estrutural é acompanhada por mudanças profundas nas propriedades físico-químicas do PrP. Existem indicações de que o PrP<sup>Sc</sup> age como um molde, sendo que o PrP<sup>C</sup> em contato com sua superfície é re-enovelado em uma molécula nascente de PrP<sup>Sc</sup>, através de um processo facilitado por outra proteína, chamada de proteína X por Prusiner (PRUSINER, 1998b).

Em contraste com patógenos que possuem um genoma e que codificam propriedades linhagem-específicas nos genes, prions parecem encerrar essas propriedades na estrutura terciária do PrP<sup>Sc</sup> (PRUSINER *et al.*, 1998a). Os prions sintetizados *de novo*, ou seja, sintetizados no novo hospedeiro para o qual passaram, refletem a seqüência do gene do PrP do hospedeiro, e não daquela da molécula do PrP<sup>Sc</sup> inoculado, derivada do doador. Os fatores que contribuem para a barreira entre espécies são, principalmente, a diferença entre as seqüências do PrP do doador e do receptor e as especificidades da proteína X nas espécies (PRUSINER *et al.*, 1998a).

Quando as estruturas secundárias das isoformas foram comparadas por espectroscopia óptica, foi descoberto que as duas são marcadamente diferentes: o PrP<sup>C</sup> contém aproximadamente 40% de  $\alpha$ -hélice e poucas folhas- $\beta$ , enquanto o PrP<sup>Sc</sup> é composto de aproximadamente 30%  $\alpha$ -hélice e 45% folhas- $\beta$  (PRUSINER, 1998b), embora as duas proteínas possuam a mesma seqüência de aminoácidos. Ambas as isoformas carregam âncoras GPI (glicosilfosfatidilinositol). A conversão do PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>Sc</sup> é pós-traducional e ocorre depois que o PrP<sup>C</sup> alcança a superfície da célula (CAUGHEY e RAYMOND, 1991), e é localizada em microdomínios ricos em glicolípídios (*caveolae-like domains*) (TARABOULOS *et al.*, 1995).

Como o PrP passa por uma profunda transição estrutural durante a propagação do prion, parece provável que outras proteínas, como chaperonas, participam desse processo. Se a proteína X funciona como uma chaperona ainda se desconhece. De forma interessante, células infectadas com scrapie em cultura

apresentam diferenças marcantes na indução de proteínas de choque-térmico (*heat-shock proteins*) (PRUSINER, 1998b).

### 7.1.2 Características da Proteína Prion Celular

A proteína prion celular (PrP<sup>c</sup>) madura é uma sialoglicoproteína altamente conservada entre as espécies. O quadro de leitura aberta (ORF) inteiro de todos os genes de PrP<sup>c</sup> conhecidos está localizado em um exon solitário, que codifica para uma proteína de aproximadamente 250 aminoácidos. Uma seqüência sinal de 22 aminoácidos está presente na porção amino-terminal, a qual direciona o novo polipeptídeo sintetizado ao retículo endoplasmático, e uma seqüência sinal de 23 aminoácidos, codificando para a ligação a uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), está presente na porção carboxi-terminal (MARTINS *et al.*, 2001). Uma única ligação dissulfeto é formada entre duas cisteínas na porção C-terminal (LAWSON *et al.*, 2005).

O PrP<sup>c</sup> é traduzido no retículo endoplasmático, modificado enquanto passa pelo Complexo de Golgi e é transportado para a superfície celular (BORCHELT *et al.*, 1992). Possui dois sítios de glicosilação ligados a resíduos de asparagina (N-ligados). Quando o PrP<sup>c</sup> é transportado através do aparato de Golgi, ocorre a glicosilação para incluir tipos complexos de açúcares, glicosilação essa variável, resultando em espécies não-glicosiladas, mono ou diglicosiladas dependendo do número de sítios de glicosilação ocupados com cadeias de oligossacarídeos. Antes que o PrP<sup>c</sup> seja transportado à superfície celular, ocorrerá a clivagem dos peptídeos sinais carboxi e amino terminais (LAWSON *et al.*, 2005). Na superfície celular, o PrP<sup>c</sup> está concentrado em complexos insolúveis em detergente, os quais assemelham-se aos domínios semelhantes a cavéolas (VEY *et al.* 1996).

A região amino-terminal da proteína, a qual abrange aproximadamente 90 aminoácidos, praticamente não possui estrutura ordenada e não está significativamente envolvida na formação da estrutura terciária da proteína (HORNEMANN *et al.*, 1997). Essa região contém o octapeptídeo PHGGGWGQ, o qual é repetido quatro vezes e é uma das regiões mais conservadas do PrP<sup>c</sup> de mamíferos. Esse domínio amino-terminal possui 5 a 6 sítios de ligação ao cobre

(BROWN *et al.*, 1997). Essa ligação pode contribuir para a conformação do PrP<sup>c</sup>, já que a porção amino-terminal do PrP<sup>c</sup> recombinante é altamente flexível e se torna mais estruturada na presença de íons cobre (MARTINS *et al.*, 2001).

### 7.1.3 O PrP<sup>c</sup> e suas interações

O PrP<sup>c</sup> aparentemente é o principal ligante de cobre em frações de membrana cerebrais e parece controlar a atividade de outras proteínas ligantes de cobre associadas à membrana (MARTINS *et al.*, 2001). Análises de células cerebelares, que foram cultivadas em meio com baixas concentrações de cobre, revelaram que células do tipo selvagem retêm quantidades mais altas de cobre do que células cerebelares nocautes para PrP<sup>c</sup> (BROWN *et al.*, 2001). Tanto a retenção quanto a absorção do cobre para o citosol são grandemente aumentadas pela expressão do PrP<sup>c</sup> nas células cerebelares (BROWN *et al.*, 2001).

Além disso, células com altos níveis de PrP<sup>c</sup> possuem uma maior resistência ao stress oxidativo quando comparadas às células nocautes para PrP<sup>c</sup> (MARTINS *et al.*, 2001). Neurônios cerebelares e astrócitos provindos de camundongos nocautes para PrP<sup>c</sup> são mais sensíveis à toxicidade do superóxido (BROWN *et al.*, 2001), enquanto células com altos níveis de expressão de PrP<sup>c</sup> são mais resistentes ao estresse oxidativo. O PrP<sup>c</sup> regula a ativação da enzima superóxido dismutase (SOD) e inibe a geração de superóxido, podendo suprimir a apoptose através desse mecanismo (SAKUDO *et al.*, 2005). Entretanto, o PrP<sup>c</sup> que não apresenta a região de octapeptídeos repetidos, na qual liga-se o cobre, perde essa função anti-apoptótica e anti-oxidativa. Os mesmos neurônios deficientes para PrP<sup>c</sup> são também mais sensíveis à toxicidade do cobre. O estresse oxidativo e o cobre estão interligados: o cobre pode catalisar a interconversão de várias espécies de oxigênios reativos ou gerar o radical hidroxil diretamente da água (BROWN *et al.*, 1998). Portanto, seqüestrar o cobre possui benefícios protetores imediatos para células que estão sensíveis aos danos oxidativos (BROWN *et al.*, 2001).

O PrP<sup>c</sup> é expresso em neurônios em níveis mais altos que em outras células, e é altamente concentrado na sinapse, tanto pré-sinápticamente como pós-sinápticamente. Há evidências de que os microdomínios detergente-solúveis na

membrana dos neurônios, nos quais o PrP<sup>c</sup> está localizado, podem representar áreas especializadas da membrana sináptica. Uma redução na concentração de cobre foi observada em preparações sinaptossomais de camundongos nocautes para PrP<sup>c</sup>, indicando que o PrP<sup>c</sup> está envolvido na homeostase sináptica de cobre (MARTINS *et al.*, 2001). Essa atuação do PrP<sup>c</sup> na sinapse pode ter efeitos benéficos por proteger o terminal sináptico de efeitos danosos de superóxidos e de espécies reativas de oxigênio.

Uma ligação específica de alta afinidade entre PrP<sup>c</sup> e laminina, uma proteína de matriz extracelular, foi caracterizada (GRANER *et al.*, 2000). O PrP<sup>c</sup> tem papel na diferenciação neuronal, pois participa da promoção do crescimento de neuritos pela laminina. Foi demonstrado que o PrP<sup>c</sup> reconhece um domínio carboxi-terminal da cadeia  $\gamma$ 1 da laminina. Esse fato é consistente com a possível função do PrP<sup>c</sup> como uma molécula de adesão e reconhecimento celular.

Uma outra proteína identificada como um ligante de PrP<sup>c</sup> é a precursora de 37kDa do receptor de laminina (RIEGER *et al.*, 1997), o qual tem 67 kDa em sua forma madura e possui alta afinidade pela laminina. Esse receptor interage com PrP<sup>c</sup> *in vitro* e *in vivo* e é superexpressa em órgãos que acumulam PrP<sup>sc</sup>. Sabe-se que os enterócitos participam ativamente da endocitose de nutrientes, macromoléculas ou patógenos através de seu equipamento polarizado de tráfego. Os enterócitos humanos expressam o receptor de laminina de 37 kDa/67 kDa na sua região apical (MOREL *et al.*, 2005) e representam a maior população de células do epitélio intestinal. Foi proposto (MOREL *et al.*, 2005) que o prion bovino é internalizado por essas células através da endocitose dependente do receptor de laminina.

O PrP<sup>c</sup> recombinante e a proteína STI1 (stress-inducible protein 1) apresentaram ligação específica de alta afinidade no nível celular e *in vitro* (ZANATA *et al.*, 2002). A STI1 é uma proteína de choque-térmico primeiramente mostrada em um complexo macromolecular com as proteínas da família das chaperonas Hsp70 e Hsp90. Essa interação induz neuro-proteção (CHIARINI *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002). Além disso, a STI1 pode também corresponder à proteína X proposta por Prusiner, o que seria consistente com a idéia de que a barreira específica à infecção por prion estaria relacionada com a variabilidade da proteína X entre as espécies.

## 7.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

O sistema imune age através de dois mecanismos principais: resposta do tipo humoral (produção de anticorpos) e resposta imune mediada por células (citotoxicidade e regulação da resposta imune). Os linfócitos B são caracterizados pela presença de imunoglobulinas que agem como receptores específicos em sua superfície. Os anticorpos são as mesmas imunoglobulinas, as quais são secretadas pelos plasmócitos que se diferenciaram de linfócitos B depois da estimulação apropriada por um imunógeno estranho, e são responsáveis pela resposta humoral. Cada molécula de anticorpo é capaz de reconhecer e ligar-se a um epítopo específico (sítio antigênico), usualmente composto por 5 a 6 aminoácidos ou unidades de monossacarídeos que são ou lineares ou topograficamente unidos (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2002).

Uma resposta humoral policlonal é composta de anticorpos, produzidos por uma mistura de vários clones de linfócitos B, contendo variadas especificidades, afinidades e classes. Já anticorpos monoclonais são aqueles secretados por um único clone de linfócitos B. Ambos os produtos tornaram-se instrumentos essenciais em pesquisas imunológicas básicas, imunohistoquímica, testes diagnósticos, etc. (LEENAARS e HENDRIKSEN, 2005).

Entretanto, o soro policlonal contém muitos tipos diferentes de anticorpos, os quais são específicos para tipos diferentes de antígenos. O uso dessas populações mistas de anticorpos cria uma variedade de problemas em técnicas imuno-químicas. Portanto, a preparação de anticorpos homogêneos com uma especificidade definida tornou-se uma meta para as pesquisas imuno-químicas (HARLOW & LANE, 1988).

Os plasmócitos não são capazes de crescer em cultura, portanto não podem ser usados como uma fonte de anticorpos *in vitro*. Em 1975, Köhler e Milstein descreveram a obtenção de linhagens celulares em cultura que secretavam anticorpos contra células vermelhas do sangue de ovelha (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). Essas linhagens celulares foram construídas pela fusão entre uma célula de mieloma de camundongo e uma célula de baço de camundongo imunizado, fusão esta possibilitada pela utilização do vírus Sendai inativado, o qual expressa uma proteína de envelope (proteína de fusão) que funde as células em conjunto (ABBAS *et al.*, 2000).

As células de mieloma fornecem os genes corretos para a divisão celular contínua em cultura, e os plasmócitos, provindos do animal imunizado, fornecem os genes funcionais de imunoglobulinas (HARLOW & LANE, 1988). As células híbridas resultantes da fusão, chamadas hibridomas, são capazes de produzir quantidades virtualmente ilimitadas de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais produzidos por cada clone de célula de hibridoma, originário de uma única célula B, são idênticos e específicos para um único epítopo (LEENAARS *et al.*, 1999).

A utilidade dos anticorpos monoclonais provém de três características: sua especificidade de ligação, sua homogeneidade e sua habilidade de ser produzido em quantidades ilimitadas. Anticorpos policlonais, por sua vez, possuem uma viabilidade finita e estão sujeitos a possíveis mudanças de caráter durante o período de produção. Como todos os anticorpos produzidos por descendentes de uma única célula de hibridoma são idênticos, os anticorpos monoclonais são reagentes poderosos para testar a presença de um epítopo desejado. Qualquer substância capaz de desencadear uma resposta imune pode ser usada para se preparar anticorpos monoclonais (HARLOW & LANE, 1988).

O processo de desenvolvimento de anticorpos monoclonais inclui as seguintes fases de trabalho, sucessivamente: a geração de células B específicas para o antígeno, a fusão dessas células com células de mieloma, a clonagem e seleção de clones de hibridomas específicos por “diluição limitante” e a produção em larga escala de anticorpos monoclonais (LEENAARS e HENDRIKSEN, 2005). Para se fazer a escolha entre a geração de anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais, deve-se considerar a aplicação desejada desses anticorpos, o tempo e os recursos financeiros disponíveis para essa produção (LEENAARS *et al.*, 1999). No caso dos anticorpos monoclonais, os animais são imunizados com o antígeno ou misturas de antígeno/adjuvante para induzir células B específicas, as quais são obtidas do baço ou de linfonodos para a obtenção de hibridomas. O fato de que o antisoro policlonal pode ser obtido em um curto período (de 4 a 8 semanas) com pequeno investimento financeiro favorece seu uso, já que se leva aproximadamente 3 a 6 meses para produzir anticorpos monoclonais.

Mesmo nas fusões mais eficientes, apenas 1% das células iniciais são fusionadas e apenas uma em  $10^5$  formam hibridomas viáveis. Isso deixa um grande número de células não fusionadas na cultura, que precisam ser eliminadas

(HARLOW & LANE, 1988). O sucesso dessa técnica dependeu do desenvolvimento de linhagens de mieloma que não poderiam sobreviver em meio de cultura seletivo (ABBAS *et al.*, 2000), pois as células do animal imunizado não continuam a crescer em cultura, mas as células de mieloma são bem adaptadas.

As células possuem duas vias para a síntese de nucleotídeos, as vias *de novo* e de salvamento. Como as células em cultura podem sobreviver utilizando qualquer uma das vias, mutações nas enzimas responsáveis por essas vias tornaram-se alvos comumente e facilmente manipulados por mutagênese em células de mamíferos. O alvo mais comum é a enzima hipoxantina-guanina fosforiltransferase (HPRT). Ela realiza um dos passos essenciais na via de salvamento, catalisando a condensação do fosforribosil pirofosfato (PRPP) e uma base purina para formar um nucleotídeo purina monofosfato (HARLOW & LANE, 1988). Comumente as células de mieloma possuem uma mutação nessa enzima da via de salvamento. A adição de qualquer componente que bloqueie a via de síntese de nucleotídeos *de novo* forçará as células a usarem a via de salvamento. As células com a mutação nessa via morrerão nessas condições. Os híbridos entre os mielomas com a mutação e as células com a via de salvamento funcional (células do animal) serão capazes de crescer (HARLOW & LANE, 1988).

Algumas drogas são utilizadas para bloquear a síntese *de novo* de nucleotídeos. Três delas comumente usadas em estudos de hibridoma são a azaserina, a aminopterina e o metotrexato. A azaserina (O-diazoacetil-L-serina) é análoga à glutamina e se ligará covalentemente, inativando duas das enzimas essenciais na síntese *de novo* de purinas, glutamina fosforribosil amidotransferase e fosforribosil glicinamindina sintase. Adicionar azaserina ao meio de cultura bloqueará a síntese *de novo* de purinas e então forçará as células a sintetizarem nucleotídeos purinas através da via de salvamento. Portanto, um substrato para essa via deve ser incluído ao meio de seleção para que as células sobrevivam. Para a azaserina, a purina que normalmente é adicionada é a hipoxantina (meio de seleção AH) (HARLOW & LANE 1988).

O metotrexato (4-amino-10-metilfolato) e a aminopterina (4-amino-folato) são análogos ao folato e competem pela enzima dihidrofolato redutase. A competição previne a produção do tetrahidrofolato, um substrato eventualmente usado na síntese de deoxitimidina, portanto bloqueia a síntese de pirimidinas. O metotrexato e

a aminopterina indiretamente bloqueiam a síntese de purinas diminuindo o suplemento da coenzima folato. Como ambas as sínteses de purina e de pirimidina estão inibidas, ambas devem ser produzidas pela via de salvamento, e os precursores para essa via, a hipoxantina e a timidina, devem ser incluídos ao meio de seleção (meios de seleção HMT e HAT) (HARLOW & LANE, 1988).

O outro tipo de célula para a fusão deve conter os genes rearranjados de imunoglobulina que especificam o anticorpo desejado. Como é difícil purificar as células que serão parceiras apropriadas, as fusões normalmente ocorrem entre uma população mista de células isoladas de um órgão linfóide de um animal imunizado (HARLOW & LANE, 1988).

As fusões de hibridomas se tornaram rotina após a introdução do uso do polietilenoglicol (PEG). O PEG funde as membranas plasmáticas de mielomas e/ou células secretoras de anticorpos adjacentes, formando uma célula única com dois ou mais núcleos. Esse heterocarion retém esse núcleo até que as membranas nucleares se dissolvam antes da mitose. Durante a mitose, e depois de alguns ciclos de divisão, os cromossomos individuais são segregados nas células-filhas. Por causa do número anormal de cromossomos, a segregação nem sempre resulta em conjuntos idênticos de cromossomos para as células-filhas, e alguns cromossomos podem ser perdidos. Se um dos cromossomos que carrega um gene rearranjado funcional de cadeia pesada ou leve de imunoglobulina é perdido, a produção de anticorpos vai parar. Se o cromossomo perdido contém um gene usado na seleção, então o crescimento do hibridoma será instável, e as células morrerão durante a seleção (HARLOW & LANE, 1988).



## JUSTIFICATIVAS

A proteína prion celular é uma proteína altamente conservada entre as espécies. O metabolismo aberrante de sua isoforma, proteína prion scrapie, é responsável por doenças neurodegenerativas fatais e sua transmissão se dá através da interação entre a isoforma normal e a isoforma patogênica. As funções da isoforma normal não são totalmente conhecidas, mas incluem proteção contra estresse oxidativo, adesão celular, neuroproteção e sinalização celular. Além disso, o mecanismo de transmissão da molécula patológica não foi totalmente desvendado.

Anticorpos monoclonais específicos para a proteína prion podem ser de grande utilidade como ferramenta no estudo dessa molécula. Através dessas poderosas bioferramentas, pode-se investigar o papel dessa proteína na célula, sendo possível identificar possíveis interações do PrP<sup>c</sup> com outros parceiros moleculares, além da possibilidade da visualização da sua localização em células e tecidos. Portanto, esses anticorpos podem ajudar a desvendar os mecanismos pelos quais a molécula atua ou que levam à sua patogênese. Tais anticorpos também poderão ser utilizados no diagnóstico de doenças priônicas, tanto em animais como em humanos.

## OBJETIVOS

- Obter células secretoras de anticorpos específicos para a proteína prion celular através da imunização de camundongos nocautes para o PrP<sup>c</sup> com este antígeno;
- Fusionar células secretoras de anticorpos com células de mieloma, de forma a obter hibridomas secretores de anticorpos monoclonais específicos para a proteína prion celular;
- Avaliar os hibridomas obtidos quanto à secreção ou não dos anticorpos desejados com o auxílio de técnicas imunológicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.3 CULTIVO DE CÉLULAS DE MIELOMA

Células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 foram cultivadas em meio de cultura RPMI com 10% SFB (soro fetal bovino), 1mM de piruvato, 0,1mM de aminoácidos não-essenciais, 2mM de glutamina e 0,04mg/mL de garamicina. Contagens foram realizadas periodicamente para se verificar se a quantidade de células em cultura era suficiente para se fazer uma fusão. Além disso, algumas dessas células foram cultivadas em meio HAT de seleção para a certificação de que essas células não eram resistentes a esse meio.

Antes da fusão, as células foram contadas e preparadas de forma que o número desejado de células ficasse em meio RPMI sem soro, prontas para a fusão.

### 7.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO ANIMAL IMUNIZADO

Camundongo nocaute (chamado de M062), previamente imunizado com PrP<sup>c</sup> recombinante e cujo soro foi testado quanto à produção de anticorpos específicos para esse antígeno (resultados não mostrados), foi imunizado com a mesma proteína pela via intra-venosa (última imunização). As imunizações prévias foram realizadas em cinco doses, através da via intra-peritoneal, com 30 dias de intervalo entre elas. Nestas imunizações foram injetados 12µg de PrP<sup>c</sup> recombinante, em 8µL de óleo mineral (adjuvante completo de Freund foi utilizado apenas na primeira imunização) e 1mg de hidróxido de alumínio. A imunização intra-venosa foi realizada aproximadamente 1 ano após a última imunização intra-peritoneal, e foram inoculados por esta via 10µg de PrP<sup>c</sup> recombinante diluído em solução de PBS.

Três dias após a última imunização (intra-venosa), o animal foi sangrado para a obtenção dos anticorpos policlonais, que seriam posteriormente utilizados como controle positivo para os testes imunológicos com os hibridomas obtidos.

Imediatamente após a sangria, o camundongo foi sacrificado e levado para dentro do fluxo laminar e aberto de forma que fosse possível retirar seu baço (órgão

linfóide). O baço retirado foi então mergulhado em meio RPMI com 0,04mg/mL de Garamicina, sem soro. Duas lâminas foram utilizadas para dissociar as células da “cápsula” do órgão, de forma que essa cápsula ficasse transparente. Os grumos de células foram desfeitos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Esse meio de cultura com as células do baço foi filtrado com filtro de *nylon*.

O meio filtrado repleto de células foi então centrifugado por 10 minutos a 400g. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado, com as células, foi desfeito. A lise de heritrócitos foi realizada com a adição de 5mL de uma solução de cloreto de amônio (165mM), aguardando-se 5 minutos, com as células em banho de gelo, para que a lise ocorresse com sucesso. Adicionou-se 25mL de meio RPMI sem soro foram adicionados para posterior centrifugação a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado em meio RPMI sem soro e novamente centrifugado. Esse último passo foi novamente repetido para que a solução de lise fosse totalmente retirada das células.

Ao final da última centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 20mL de meio RPMI sem soro para a contagem do número total de células obtidas do baço.

## 7.5 FUSÃO DAS CÉLULAS DE MIELOMA COM AS CÉLULAS DO BAÇO

As células de mieloma e as células do baço foram unidas em um mesmo frasco com RPMI sem soro, numa proporção de 5 células de baço para 1 célula de mieloma. Essa mistura de células foi centrifugada a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente retirado para que praticamente não restasse meio de cultura, e o *pellet* foi desfeito com batidas no fundo do frasco.

O frasco com as células foi então colocado em banho-maria, a aproximadamente 37°C (dentro do fluxo laminar), e 1 mL da solução de PEG (polietilenoglicol) foi gotejada, durante 2 min, enquanto o frasco era submetido a movimentos circulares. Em seguida, 1mL de meio RPMI sem soro foi então adicionado vagarosamente durante 1 min, o que se repetiu mais uma vez. Então, foram adicionados mais 7mL de meio durante o período de 2 min. Essa solução foi centrifugada a 400g por 5 min.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em meio RPMI 15% SFB, 1mM de piruvato, 0,1mM de aminoácidos não-essenciais, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de garamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina de forma que houvesse  $2,5 \times 10^6$  células por mL de meio. O volume final obtido foi distribuído em 3 placas de cultura de 96 poços, de forma que cada poço recebesse 100µL da solução de células.

## 7.6 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS APÓS A FUSÃO

Vinte e quatro horas após a fusão foi adicionado às células o meio de seleção RPMI-HAT 15% SFB, 1mM de piruvato, 0,1mM de aminoácidos não-essenciais, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de garamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina. O meio de cultura era trocado de 48 em 48 horas, de forma que por mais 4 trocas o meio de seleção continuou sendo adicionado.

A partir da 5ª troca o meio adicionado não era mais o meio de seleção, mas sim o meio RPMI-HT 15% SFB, 1mM de piruvato, 0,1mM de aminoácidos não-essenciais, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de garamicina 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina, e permaneceu assim por 4 trocas consecutivas de meio. Daí por diante o meio de cultura adicionado era o meio de cultura normal RPMI 15% SFB, 1mM piruvato, 0,1mM de aminoácidos não-essenciais, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de garamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina.

As células eram frequentemente verificadas quanto ao crescimento, e os poços que possuísem mais de 80% de confluência celular eram submetidos a testes para a verificação da produção ou não de anticorpos.

## 7.7 TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS (SCREENING)

### 7.7.1 Ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Ensaios de ELISA de captura de anticorpo foram empregados para se analisar quais eram os hibridomas secretores de anticorpos. O método consiste em sensibilizar cada poço da placa de ELISA com 0,1µg de PrP<sup>c</sup> recombinante (antígeno), cedido pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, em 50µL de tampão carbonato 50mM pH 9,7. A placa com a solução de antígeno deve ser deixada a 4°C por aproximadamente 16 horas, para que a proteína seja devidamente adsorvida na placa. No dia seguinte, a placa é lavada com solução de PBST 0,05% e então bloqueada por 1h a 37°C com 100µL da solução de bloqueio PBS-BSA 1%. A solução de bloqueio é descartada e 100µL dos meios de cultura, no qual cresceram os hibridomas a serem testados, são adicionados a cada poço da placa de ELISA. Para que os anticorpos presentes no meio se liguem devidamente ao antígeno, deve-se deixar a placa incubando por 2 a 3 horas a 37°C. Em seguida, a placa é lavada com PBST 0,05%, e cada poço é incubado por 45 minutos a 37°C com 100µL de solução de anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à enzima peroxidase (1:5000), em solução de PBS-BSA 0,1%. Novamente a placa é lavada e então adiciona-se a cada poço 100µL da solução de revelação: tampão citrato (50mM fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (o-fenildiamina) (0,2mg/mL de tampão citrato) e peróxido de hidrogênio 30% (2 µL/mL de tampão citrato). Após 15 min de incubação no escuro, na temperatura ambiente, a revelação é interrompida com 100µL por poço de solução de ácido sulfúrico 2M, possibilitando a leitura em leitor de microplacas com filtro de 490nm.

### 7.7.2 Ensaios de *Immunoblot*

Ensaios de *immunoblot* foram realizados para a confirmação dos resultados obtidos nos ensaios de ELISA. O *immunoblot* consistia em correr extrato de encéfalo

de camundongo, submetido à precipitação com 30% de sulfato de amônio e por isso chamado de fração 30% de extrato de encéfalo, em gel 12% de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE). As corridas eram realizadas com corrente constante de 15mA. Após a corrida, os géis foram submetidos a nova corrente elétrica, mas dessa vez para que as amostras contidas neles fossem eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose. Essas membranas, por sua vez, eram bloqueadas durante 1h em solução de TBST com 5% de leite em pó desnatado (TBST-leite). Após o bloqueio, eram adicionados os sobrenadantes das culturas a serem testadas, incubados na membrana por aproximadamente 16h a 4°C. As membranas eram então submetidas a lavagens com TBST 0,05%. O anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo com enzima peroxidase conjugada (1:3000) em TBST-leite, era incubado por 1h na temperatura ambiente. As membranas eram submetidas a nova lavagem com TBST 0,05% e a solução de peróxido de hidrogênio com luminol (Amersham - Pharmacia), a qual é o substrato para a reação quimioluminescente da enzima peroxidase conjugada ao anticorpo, era adicionada para que fosse possível a revelação. Filmes (Kodak) com grande sensibilidade eram expostos à membrana e revelados em quarto escuro até o aparecimento do sinal adequado.

## 7.8 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS NOCAUTES

Três camundongos *nocautes*, chamados de M081, M082 e M083, os quais não expressam a proteína PrP<sup>C</sup>, foram submetidos a 3 imunizações após os experimentos com os hibridomas. Na primeira imunização foram inoculados em cada camundongo, pela via intra-peritoneal, 10µg da proteína recombinante PrP<sup>C</sup> (0,47µg/µL), 21,3µL de adjuvante completo de Freund, 16µL de hidróxido de alumínio (1mg de hidróxido de alumínio em 100µL da solução com o antígeno) e 41,4µL de PBS, totalizando um volume de 100µL. Na segunda e na terceira imunização, que foram efetuadas 14 e 28 dias após a primeira, respectivamente, foram inoculados em cada camundongo 5µg de PrP<sup>C</sup> recombinante, 10,6µL de óleo mineral, 16µL de hidróxido de alumínio e 62,8µL de PBS. Três dias após a última imunização os camundongos foram sangrados pelo plexo orbital. Os soros obtidos

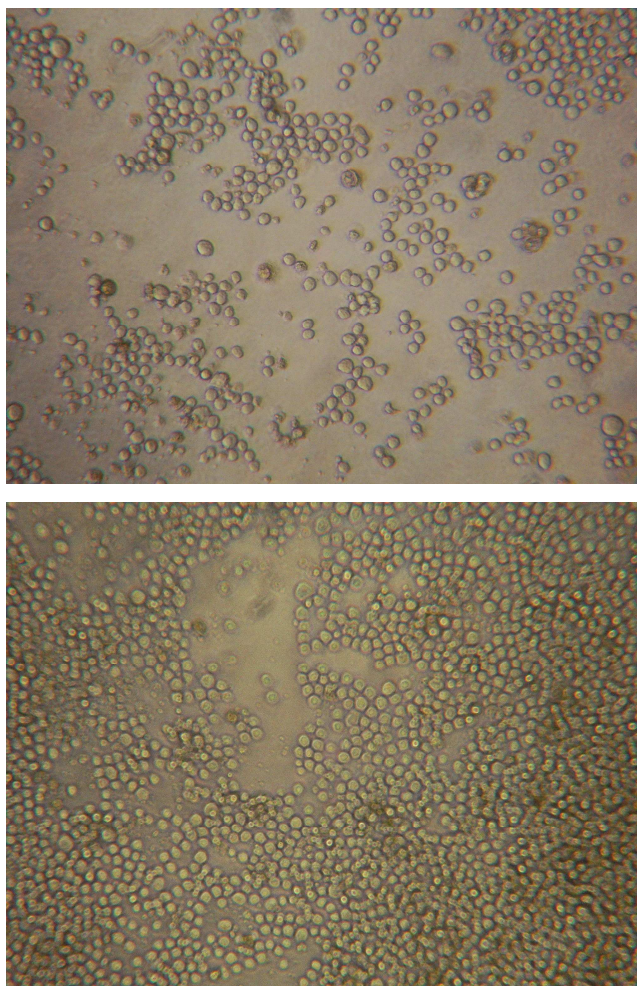
após o sangramento foram testados, em diversas diluições, através de ensaios de ELISA de captura de anticorpos e em ensaios de *immunoblot* (já descritos).



## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.9 FUSÃO DOS HIBRIDOMAS

A fusão entre as células de mieloma e as células esplênicas ocorreu com sucesso, pois foi possível verificar que praticamente todos os poços das 3 placas de 96 poços possuíam células que sobreviveram ao meio de seleção. Na figura 1 pode-se observar alguns desses poços:

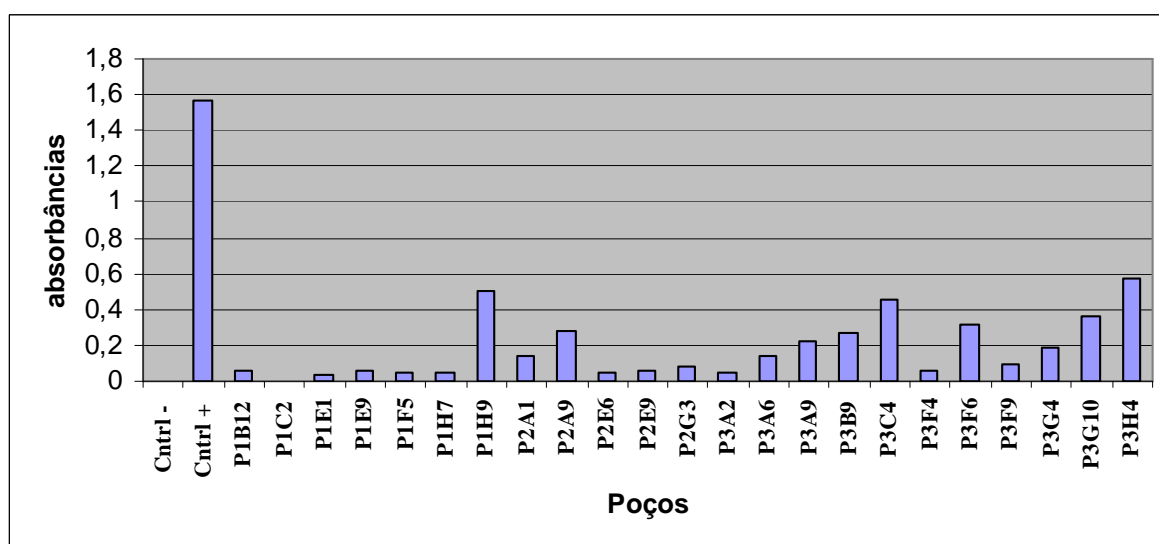


**FIGURA 1** – CÉLULAS DE HIBRIDOMAS VIÁVEIS. As fotografias correspondem a clones de hibridomas observados em microscópio de contraste de fase (aumento: 100x) duas semanas após a fusão. As células observadas sobreviveram ao meio de seleção, portanto são células de mieloma fusionadas com células esplênicas.

## 7.10 TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS

Periodicamente as placas eram verificadas quanto à confluência celular nos poços. Quando houvesse a constatação de que havia aproximadamente 80% de confluência, o sobrenadante da cultura correspondente a esses poços era testado através de ELISA. Esse sobrenadante deveria estar sobre as células por no mínimo três dias, pois as células secretoras de anticorpos o fazem no meio de cultura, mas, quando há constantes trocas de meio, tais anticorpos são descartados e sua concentração passa a ser muito baixa para a detecção no ensaio.

No total foram testados 263 poços das 3 placas iniciais em 8 testes de ELISA. Os resultados obtidos eram analisados como no gráfico seguinte (GRÁFICO 1):

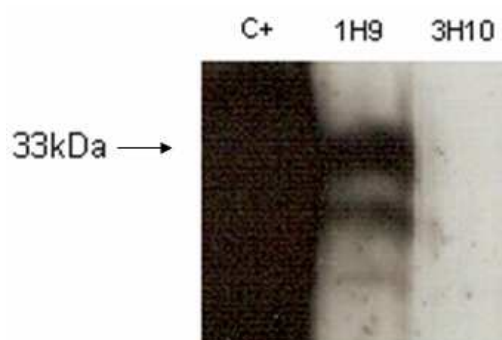


**GRÁFICO 1** – RESULTADO DO 1º ELISA PARA A TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTI-PrP<sup>c</sup>. O ensaio foi feito com a imobilização de PrP<sup>c</sup> recombinante em placa de ELISA e com a adição dos sobrenadantes das culturas de clones de hibridomas, como descrito em Materiais e Métodos. **Cntrl-**: controle negativo (sobrenadante da cultura de mieloma). **Cntrl+**: controle positivo – anticorpo policlonal de camundongo nocaute imunizado com PrP<sup>c</sup>. **P1, P2 e P3**: placas 1, 2 e 3 das culturas dos hibridomas resultantes da fusão, respectivamente. **B12, C2, E1**, etc.: posições dos poços, com os clones de hibridomas testados, em suas respectivas placas. Foram considerados positivos os sobrenadantes que atingiram absorbância maior que 0,3.

Nesse caso, foram considerados resultados positivos os sobrenadantes que atingiram absorbância maior que 0,3. As células consideradas positivas nesse ELISA que, portanto, foram expandidas e novamente testadas, foram as correspondentes aos poços P1H9, P3C4, P3F6, P3G10 e P3H4. Além desses

poços, seis outros foram considerados positivos nos ELISAs seguintes (resultados não mostrados).

Algumas das células expandidas foram testadas também através de ensaios de *Immunoblot*. Esses ensaios foram realizados para a confirmação de que os sobrenadantes, aparentemente positivos nos ensaios de ELISA, de fato reconheciam a proteína PrP<sup>c</sup>, a qual está presente em abundância em extratos de encéfalo. Portanto, extrato de encéfalo de camundongo, precipitado com 30% de sulfato de amônio (Fração 30%), era separado em gel e eletro-transferido para membrana de nitrocelulose, a qual, por sua vez, era incubada com o sobrenadante das culturas expandidas. Apenas um resultado positivo foi obtido através deste ensaio (FIGURA 2).



**FIGURA 2 – IMMUNOBLLOT COM OS SOBRENADANTES DOS HIBROMAS EXPANDIDOS.** Este ensaio foi executado como descrito em materiais e métodos. **C+**: Controle positivo – anticorpo policlonal de camundongo nocaute imunizado. **1H9**: sobrenadante da cultura dos clones correspondentes ao poço P1H9, já expandidos. **3H10**: sobrenadante da cultura dos clones correspondentes ao poço P3H10, já expandido. Além do controle positivo, somente o sobrenadante dos hibridomas do poço 1H9 reage com o PrP<sup>c</sup> presente em extrato de encéfalo de camundongo neste ensaio.

No ensaio de *immunoblot* é possível observar que o sobrenadante da cultura 1H9 reagiu com o PrP<sup>c</sup> da fração 30% de extrato de encéfalo, pois há um padrão de três bandas reconhecido por ele. Esse padrão é correspondente às formas di, mono e não-glicosiladas do PrP<sup>c</sup> (da banda mais pesada para a mais leve, respectivamente). No controle positivo não é possível distinguir as três bandas, pois o soro policlonal reage muito fortemente. Já o sobrenadante da cultura 3H10 não reagiu com o PrP<sup>c</sup> neste ensaio, apesar de ter reagido no ensaio de ELISA.

Devido a esse resultado positivo com o sobrenadante das células correspondentes ao poço 1H9 e a repetição de positividade em ensaios subseqüentes de ELISA com o sobrenadante do poço 3H4, estas culturas foram submetidas à diluição limitante para que houvesse apenas uma célula em cada poço da placa de 96 poços de cultura. Isso impede a competição por nutriente e por espaço entre as células secretoras e as não secretoras de anticorpos, além de garantir que haja de fato apenas um clone secretor de anticorpos em cada poço (monoclonal). As células submetidas a essa diluição também eram observadas periodicamente para a verificação da confluência para serem testadas pelo ensaio de ELISA. Foi observado que essas células não mais reagiam com o PrP<sup>c</sup> em ELISA. Além disso, a tentativa de confirmar o resultado do *immunoblot* mostrado acima (FIGURA 2) foi frustrada (dados não mostrados). Aparentemente, as células que antes secretavam anticorpos pararam de secretá-los ou morreram.

Muitos trabalhos publicados a respeito de anticorpos monoclonais relatam que alguns dos hibridomas positivos nas primeiras triagens passam a ser negativos após a reclonagem, devido à sua instabilidade (ANDRIEVSKAIA *et al.*, 2006; ZANUSSO *et al.*, 1998). Williamson *et al.* (1996) obtiveram sucesso em fusões entre células de camundongos nocautes imunizados com PrP<sup>c</sup> e células P3X63Ag8.653, que resultavam em hibridomas secretores de anticorpos, mas dentro de um período curto de tempo as células de hibridoma paravam de secretar anticorpos anti-PrP<sup>c</sup> ou morriam. Presume-se, portanto, que os anticorpos anti-PrP<sup>c</sup> interagem com o PrP<sup>c</sup> dentro ou na superfície das células de hibridoma, suprimindo a produção de anticorpos ou induzindo a morte das células secretoras (WILLIAMSON *et al.*, 1996).

A presença do PrP<sup>c</sup> na superfície de células de mamíferos, aliada ao fato de o PrP<sup>c</sup> ser altamente conservado entre as espécies, causa o seu reconhecimento como próprio, então restringindo a habilidade de camundongos de produzir uma resposta imune para o imunógeno PrP. Embora este problema tenha sido aliviado com a geração e uso de camundongos nocautes para o PrP, a produção de anticorpos monoclonais continuou a ser dificultada, presumivelmente porque o parceiro de fusão para os linfócitos derivados do baço são linhagens de células de mieloma contendo PrP<sup>c</sup> (KIM *et al.*, 2003).

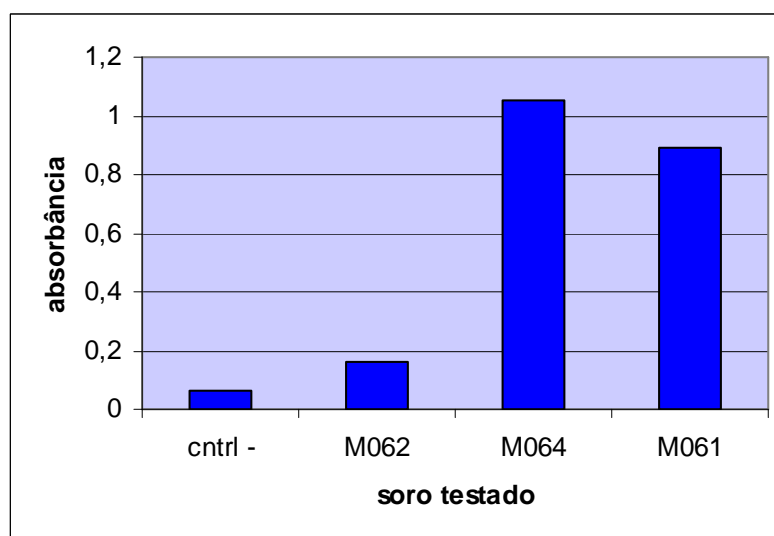
O PrP<sup>c</sup> participa de vias de transdução de sinal que afetam a viabilidade celular. A expressão do PrP<sup>c</sup> na superfície de linfócitos é aumentada pela ativação

celular induzida por mitógenos (CASHMAN *et al.*, 1990). Anticorpos policlonais e monoclonais direcionados para o PrP<sup>C</sup> podem suprimir essa ativação e inibir a proliferação celular (CASHMAN *et al.*, 1990; LI *et al.*, 2001). Supõe-se que os anticorpos monoclonais induzem uma ligação cruzada entre as proteínas PrP<sup>C</sup>, o que deve impedir interações com algumas proteínas sinalizadoras (LI *et al.*, 2001). Esse é um exemplo de como os anticorpos secretados pelas células de hibridoma podem afetar funções desempenhadas pelo PrP<sup>C</sup>.

Devido aos problemas enfrentados no estabelecimento de hibridomas estáveis secretores de anticorpos anti-PrP<sup>C</sup>, Kim *et al.* (2003) investigaram a expressão do PrP<sup>C</sup> em duas linhagens diferentes de mieloma. Constatou que, comparadas às células P3-X63-Ag8.653, as células de mieloma da linhagem SP2/0-Ag14 expressam muito menos PrP<sup>C</sup> em ambos os níveis de transcrição e de tradução. Atualmente, existem inúmeras publicações com a obtenção de hibridomas estáveis secretores de anticorpos monoclonais específicos para o PrP<sup>C</sup>. Na maioria dessas publicações, a linhagem de mieloma utilizada foi a SP2/0-Ag14 (ANDRIEVSKAIA *et al.*, 2006; HARMEYER *et al.*, 1998; ZANUSSO *et al.*, 1998). Esse fato corrobora a hipótese de que a presença do PrP<sup>C</sup> na superfície celular dos hibridomas secretores de anticorpos afeta a sua viabilidade. Portanto, a linhagem utilizada na fusão do presente trabalho pode ser uma das causas da instabilidade dos hibridomas positivos obtidos.

Outro fator determinante para o sucesso na produção de anticorpos poli ou monoclonais é a resposta imune do animal imunizado. Recomenda-se que o camundongo a ser imunizado seja livre de qualquer infecção concorrente e tenha de 6 a 8 semanas de idade, pois a resposta imune é imatura em pequenas idades e diminui com o aumento da idade após esse período (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2002). As células esplênicas retiradas desse animal devem estar produzindo anticorpos durante o período de fusão, mas nesse caso o camundongo utilizado havia sido imunizado há quase um ano. Embora o soro deste camundongo tenha sido testado logo após as imunizações e tenha sido verificado um bom título de anticorpos em ensaios de ELISA e de *immunoblot* (resultados não mostrados), o camundongo já não apresentava uma resposta imune tão eficaz quando a fusão foi realizada, mesmo com a imunização intra-venosa três dias antes da fusão. Este fato foi verificado em um ensaio de ELISA, realizado após a fusão, no qual pôde-se

constatar que o soro do animal utilizado na fusão não possuía bom título (GRÁFICO 2). Neste ensaio, o soro do camundongo M062 foi comparado com o soro de outros camundongos nocautes (M064 e M061) imunizados na mesma época e com a mesma dose de PrP<sup>c</sup> recombinante. Os baços desses dois animais foram utilizados em fusões anteriores (resultados não-mostrados). Portanto, as células esplênicas do animal M062 que de fato secretavam anticorpos deveriam estar em pequeno número, diminuindo a probabilidade da obtenção de hibridomas secretores de anticorpos. Por isso, julgou-se necessária a imunização de novos camundongos nocautes, com a idade apropriada, que serão utilizados em futuras fusões.



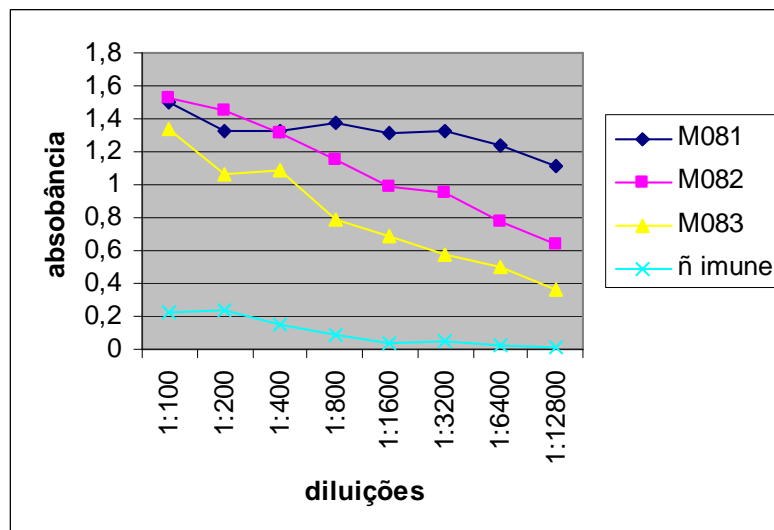
**GRÁFICO 2 – TESTE DE ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPOS COM O SORO DO CAMUNDONGO UTILIZADO NA FUSÃO.** Este ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos. O soro do camundongo utilizado na fusão, chamado **M062**, foi comparado com o soro de outros camundongos (**M064** e **M061**). Todos os soros foram incubados na mesma diluição: 1:4000. O soro do camundongo M062 reage muito mais fracamente com o PrP<sup>c</sup> recombinante em comparação com os demais soros.

## 7.11 SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP<sup>c</sup>

### 7.11.1 Ensaio de ELISA de captura de anticorpos

Os soros dos camundongos M081, M082 e M083 foram testados no ensaio de ELISA em diluições seriadas. Como parâmetro para comparações, soro de camundongo não-imunizado foi também submetido às mesmas diluições e incubado

na placa de ELISA com o PrP<sup>c</sup> recombinante. O resultado obtido, a partir da diluição 1:100 até a diluição 1:12800, está ilustrado no GRÁFICO 3:



**GRÁFICO 3** – ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPOS COM OS SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP<sup>c</sup>. Os soros testados neste ensaio são providos de camundongo não imune (controle negativo) e dos camundongos imunizados com o PrP<sup>c</sup> recombinante (camundongos M081, M082 e M083). Todos os soros foram submetidos a diluições seriadas, de 1:100 até 1:12800, e foram incubados na placa de ELISA imobilizada com PrP<sup>c</sup> recombinante (como descrito em Materiais e Métodos). O melhor título neste ensaio de ELISA é o do soro do camundongo M081.

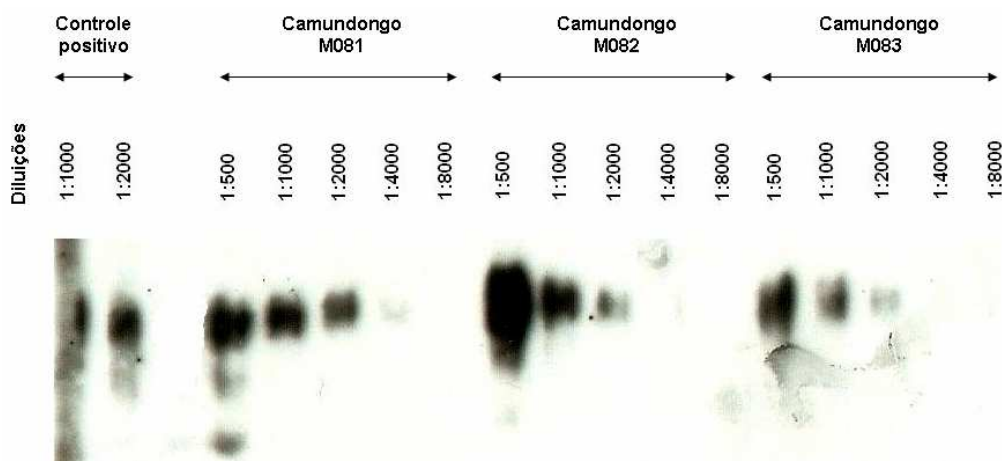
Em comparação com o soro de camundongo não-imune, todos os soros dos camundongos imunizados reagem bem com o PrP<sup>c</sup> recombinante imobilizado na placa de ELISA. O soro que aparentemente está reagindo melhor neste ensaio é o soro do camundongo M081.

#### 7.11.2 Ensaio de *Immunoblot*

Os soros dos mesmos camundongos foram submetidos à diluição seriada, de 1:500 a 1:8000, e testados no ensaio de *immunoblot*. Assim como no *immunoblot* para testar os hibridomas, obteve-se um gel fração 30% de encéfalo de camundongo e realizou-se a eletro-transferência para membrana de nitrocelulose. Para a diluição seriada dos soros, os anticorpos foram incubados na membrana com o auxílio do



aparato Multi-Screen (Bio-Rad). Os soros reconheceram especificamente a proteína prion celular da fração 30% de extrato de encéfalo (FIGURA 3), principalmente na diluição de 1:500.



**FIGURA 3 – IMMUNOBLOT COM OS SOROS DOS CAMUNDONGOS NOCAUTES IMUNIZADOS COM PrP<sup>c</sup>.** Os soros dos camundongos imunizados com PrP<sup>c</sup> recombinante foram incubados na membrana de nitrocelulose, na qual foi eletrotransferida a fração 30% de encéfalo de camundongo (como descrito em materiais e métodos). Os soros dos camundongos M081, M082 e M083 foram incubados em diluições seriadas, de 1:500 até 1:8000. Controle positivo – soro de camundongo previamente imunizado e com título já conhecido, incubado nas diluições 1:1000 e 1:2000. O soro com melhor título neste ensaio de *immunoblot* é o do camundongo M081, e todos os soros reconhecem o PrP<sup>c</sup> em títulos de até 1:2000.

Portanto, os três camundongos estão produzindo anticorpos reativos nos ensaios de *immunoblot*, capazes de reconhecer o PrP<sup>c</sup> da fração 30% de extrato de encéfalo em diluições de até 1:2000. O soro que reage mais fortemente neste ensaio é o do camundongo M081, mas todos os camundongos podem ser utilizados em fusões posteriores.

Como observado com os resultados acima, o soro que reage melhor no ensaio de ELISA e de *immunoblot* é o do camundongo M081. É notável, no entanto, que em ambos os ensaios o soro M082 reage mais fortemente nas diluições iniciais. Entretanto, essa reação decai mais significativamente que o soro M081, que permanece reagindo, no ensaio de *immunoblot*, até a diluição de 1:4000. No resultado do ensaio de ELISA (GRÁFICO 3) é possível perceber que o soro M081 reage de forma similar desde a diluição de 1:100 até a de 1:3200, e a reatividade só decai a partir da diluição de 1:6400. Isso indica que o soro já está saturado na diluição de 1:3200, e em concentrações maiores que essa o soro permanece reagindo da mesma forma. Em contrapartida, o soro M082, apesar de reagir mais



fortemente na diluição de 1:100 no ensaio de ELISA (GRÁFICO 3) e na diluição de 1:500 no ensaio de *immunoblot* (FIGURA 3), não encontra-se saturado nas diluições realizadas nesses ensaios.

Uma possível causa para essa diferença entre os soros M081 e M082 pode estar na natureza do soro policlonal. Como já citado anteriormente, o soro policlonal contém uma mistura de anticorpos, com diversas especificidades e afinidades, pois são produzidos por vários linfócitos B diferentes. Portanto, cada animal terá uma resposta característica, e produzirá anticorpos específicos para diferentes regiões da proteína utilizada como antígeno. Nesse caso, o soro do camundongo M082 deve possuir vários anticorpos reconhecendo epítomos diferentes do PrP<sup>c</sup> e, por isso, não está saturado em concentrações maiores, pois esses anticorpos não estão competindo pelas mesmas regiões da proteína. Em contrapartida, o soro M081 provavelmente possui uma maior concentração de anticorpos, no entanto, em comparação com o soro M082, deve ser composto por uma menor diversidade de anticorpos, os quais reconhecem os mesmos epítomos e, por isso, o soro encontra-se saturado em concentrações maiores.

## CONCLUSÕES

A partir do exposto nesse trabalho, pode-se concluir que:

- O protocolo de fusão utilizado é eficaz, pois a fusão foi bem sucedida resultando na obtenção de hibridomas secretores de anticorpos específicos para o PrP<sup>C</sup>.
- Apesar da obtenção de resultados positivos, não foi possível estabelecer hibridomas estáveis, pois os hibridomas secretores de anticorpos pararam de secretá-los ou morreram.
- Um possível obstáculo para a obtenção de hibridomas estáveis secretores de anticorpos anti-PrP<sup>C</sup> é a linhagem de mieloma utilizada, a qual expressa grande quantidade de PrP<sup>C</sup> em sua membrana celular. Portanto, os anticorpos secretados provavelmente ligam-se ao PrP<sup>C</sup> presente na célula e impedem-no de desempenhar funções tais como a de modulador da proliferação celular.
- O camundongo utilizado na fusão do presente trabalho estava com idade avançada e, por isso, provavelmente não possuía o número adequado de plasmócitos secretores de anticorpos, o que representa um problema para a produção de anticorpos monoclonais.
- Os camundongos nocautes imunizados possuem soros que reconhecem especificamente o PrP<sup>C</sup> tanto em ensaios de ELISA quanto em ensaios de *immunoblot* e, portanto, podem ser utilizados em fusões posteriores.

## PERSPECTIVAS

A partir do que foi discutido nesse trabalho, surgem algumas perspectivas para trabalhos futuros:

- Para a produção de anticorpos monoclonais específicos para o PrP<sup>c</sup>, deve-se utilizar a linhagem de mieloma SP2/0-Ag14 fusionada às células esplênicas dos camundongos imunizados, que devem estar com idade adequada.
- Como o protocolo de fusão já está bem estabelecido pelo grupo do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, pode-se investir na produção de anticorpos monoclonais específicos para outras proteínas estudadas neste laboratório.
- Com o estabelecimento de hibridomas estáveis, pode-se investigar os epítomos reconhecidos pelos anticorpos produzidos, utilizando a espectrometria de massa como ferramenta para tal investigação (MACHT *et al.*, 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular. Revinter*, 3ª Edição, 2000.

ANDRIEVSKAIA, O.; MCRAE, H.; ELMGREN, C.; HUANG, H.; BALACHANDRAN, A.; NIELSEN, K. Generation of Antibodies against Bovine Recombinant Prion Protein in Various Strains of Mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, p. 98-105, 2006.

BORCHELT, D. R.; TARABOULOS, A.; PRUSINER, S. B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 16188-16199, 1992.

BROWN, D. R.; SCHIMIDT, B.; KRETZSCHMAR, H. A. Effects of Copper on Survival of Prion Protein Knockout Neurons and Glia. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, nº 4, 1998.

BROWN, D. R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **TRENDS in Neurosciences**, v. 24, nº 2, p. 85-90, 2001.

BROWN, D. R.; QIN, K.; HERMS, J. W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P. E.; KRUCK, T.; VON BOHLEN, A.; SHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D.; KRETZSCHMAR. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. **Nature**, v. 390, 1997.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guidelines on: antibody production. 2002.

CASHMAN, N. R. *et al.* Cellular Isoform of the Scrapie Agent Protein Participates in Lymphocyte Activation. **Cell**, v. 61, p. 185-192, 1990.

CAUGHEY, B.; RAYMOND, G. J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 18217-18223, 1991.

CHIARINI, L. B.; FREITAS, A. R.; ZANATA, S. M.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J.**, v. 21, p. 3317-3326, 2002.

GRANER, E. *et al.* Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Molecular Brain Research**, v. 76, p. 85-92, 2000.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: a laboratory annual. **CSH Press**, 1988.

HARMEYER, S.; PFAFF, E.; GROSCHUP, M. H. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 937-945, 1998.

HORNEMANN, S.; KORTH, C.; OESCH, B.; RIEK, R.; WIDER, G.; WÜTHRICH, K.; GLOCKSHUBER, R. Recombinante full-length murine prion protein mPrP (23-231): purification and spectroscopic characterization. **FEBS Letters**, v. 413, p. 277-281, 1997.

KIM, J.; KUIZON, S.; RUBENSTEIN, R. Comparison of PrP transcription and translation in two murine myeloma cell lines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, p.137-142, 2003.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

LAWSON, V. A.; COLLINS, S. J.; MASTERS, C. L.; HILL, A. F. Prion protein glycosylation. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, p. 793-801, 2005.

LEENAARS, M. *et al.* The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. **ATLA**, v. 27, p. 79-102, 1999.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. R. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. **ILAR journal**, v. 46, nº 3, 2005.

LI, R. *et al.* The Expression and Potential Function of Cellular Prion Protein in Human Lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 207, p. 49-58, 2001.

MACHT, M.; MARQUARDT, A.; DEININGER, S.; DAMOC, E.; KOHLMANN, M.; PRZYBYLSKI, M. "Affinity-proteomics": direct protein identification from biological material using mass spectrometric epitope mapping. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, p. 1102-1111, 2004.

MARTINS, V. R.; MERCADANTE, A. F.; CABRAL, A. L. B.; FREITAS, A. R. O.; CASTRO, R. M. R. P. S. Insights into the physiological function of cellular prion protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p. 585-595, 2001.

MORE, E. *et al.* Bovine Prion is Endocytosed by Human Enterocytes via the 37 kDa/67 kDa Laminin Receptor. **American Journal of Pathology**, v. 167, nº 4, 2005.

PRUSINER, S. B. Molecular Biology and pathogenesis of prion diseases. **TIBS**, v. 21, p. 482-487, 1996.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M. R.; DEARMOND, S. J.; COHEN, F. E. Prion Protein Biology. **Cell**, v. 93, p.337-348, 1998a.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p. 13363-13383, 1998b.

RIEGER, R.; EDENHOFER, F.; LASMÉZAS, C. I., WEISS, S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. **Nat. Med.**, v.12, p. 1383-1388, 1997.

SAKUDO, A. *et al.* PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p. 14-19, 2005.

TARABOULOS, A.; SCOTT, M.; SEMENOV, A.; AVRAHAMI, D.; LASZLO, L.; PRUSINER, S. B. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. **J. Cell Biol.**, v. 129, p. 121-132, 1995.

VEY, M.; PILKUHN, S.; WILLE H.; NIXON, R.; DEARMOND, S. J.; SMART, E. J.; ANDERSON, R. G. W.; TARABOULOS, A.; PRUSINER, S. B. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 14945-14949, 1996.

WILLIAMSON, R. A. *et al.* Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 7279-7282, 1996.

ZANATA, S.M. *et al.* The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO journal**, v. 21, p. 3307-3316, 2002.

ZANUSSO, G. *et al.* Prion protein expression in differen species: Analysis with a panel of new mAbs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 8812-8816, 1998.